AUS DEM INSTITUT FUER PHARMAKOLOGIE UND BIOCHEMIE
DER VETERINAER-MEDIZINISCHEN FAKULTAET
DER UNIVERSITAET ZUERICH
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)
Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. & phil. II C.C. Kuenzle

---

DNS-POLYMERASE ß AUS NEURONEN DER GROSSHIRNRINDE DER RATTE

Charakterisierung und Vergleich mit anderen ß-Polymerasen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
JÜRG WASER
Tierarzt
von Adlikon (ZH) und Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C.C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1979
aku-Fotodruck

AUS DEM INSTITUT FUER PHARMAKOLOGIE UND BIOCHEMIE
DER VETERINAER-MEDIZINISCHEN FAKULTAET
DER UNIVERSITAET ZUERICH
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)
Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. & phil. II C.C. Kuenzle

---

DNS-POLYMERASE ß AUS NEURONEN DER GROSSHIRNRINDE DER RATTE

Charakterisierung und Vergleich mit anderen ß-Polymerasen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
JÜRG WASER
Tierarzt
von Adlikon (ZH) und Zürich

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C.C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1979
aku-Fotodruck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. DNS-Synthese	1
1.1.1. DNS-Replikation	1
1.1.2. DNS-Reparatur	1
1.2. Funktionen der DNS-Polymerasen	2
1.2.1. DNS-Polymerase α	2
1.2.2. DNS-Polymerase β	4
1.2.3. DNS-Polymerase γ	5
2. PROBLEMSTELLUNG	6
3. MATERIAL	7
3.1. Tiermaterial	7
3.2. Chemikalien	7
3.3. Apparate	8
4. METHODEN	8
4.1. Herstellung von Matrizen	8
4.2. DNS-Polymerase-Bestimmung	8
4.3. 3'-5'-Exonuklease-Nachweis	9
4.4. Molekulargewichtsbestimmung	9
4.5. Sedimentationsanalyse in Glyceringradienten	9
4.6. Isoelektrische Fokussierung in Polyakrylamidgelen	10
4.7. Proteinbestimmung	10
4.8. Präparation neuronaler Zellkörper	11
4.9. Isolierung der DNS-Polymerase β	11
4.9.1. Extraktion des Enzyms aus dem Gewebe	11
4.9.2. Beseitigung von Nukleinsäuren durch DEAE-Zellulose-Filtration	11
4.9.3. DEAE-Zellulose-Chromatographie	13
4.9.4. Phosphozellulose-Chromatographie	13
4.9.5. Gelfiltration auf Sephadex G-100	14
4.9.6. Affinitätschromatographie auf nativer DNS-Zellulose	14

		Seite
5.	RESULTATE UND DISKUSSION	15
	5. 1. Chromatographisches Verhalten	15
	5. 2. Molekulargewicht	15
	5. 3. Sedimentationskoeffizient	17
	5. 4. Isoelektrischer Punkt	19
	5. 5. Resistenz gegen Sulfhydrylgruppenblocker	19
	5. 6. Abhängigkeit vom pH	20
	5. 7. Abhängigkeit von der Na^{2+}- und K^{+}-Konzentration	21
	5. 8. Abhängigkeit von der Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Konzentration	22
	5. 9. Matrizen-Bevorzugung	23
	5.10. Fähigkeit zum Lesen von Poly(A)·$(dT)_{12-18}$	24
	5.11. Bestimmung der Michaeliskonstante	26
	5.12. Fähigkeit zum Einbau eines einzelnen Desoxyribonukleosidtriphosphates	26
	5.13. Fehlen von 3'-5'-Exonuklease-Aktivität	29
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	29
7.	ZUSAMMENFASSUNG	30
8.	LITERATURVERZEICHNIS	32
9.	DANKESADRESSEN	40
10.	LEBENSLAUF	41

ABKUERZUNGEN UND ERKLAERUNGEN

DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
[^{3}H]dTTP	[Methyl-^{3}H]desoxythymidin-5'-Triphosphat
DNase I	Desoxyribonuklease aus Pankreas; sie spaltet DNS in Oligonukleotide
3'-5'-Exonuklease	Enzym, welches falsch gepaarte Basen erkennt und aus der DNS herausschneidet
Ribonuklease H	Ribonuklease, die nur RNS hydrolysiert, die komplementär an DNS gebunden ist
Poly(A)	(3'-5')-Polymer von Adenosinmonophosphat
Poly(dA)	(3'-5')-Polymer von Desoxyadenosinmonophosphat
$(dT)_{12-18}$	(3'-5')-Polymer aus 12 bis 18 Desoxythymidin-bausteinen
Poly(dA-dT)	doppelsträngiges (3'-5')-Kopolymer von Desoxyadenosinmonophosphat und Desoxythymidin-monophosphat in regelmässig abwechselnder Reihenfolge
Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$	(3'-5')-Polymer von Desoxyadenosinmonophosphat assoziiert mit einem Oligomer aus 12 bis 18 Desoxythymidinmonophosphatbausteinen
Poly(A)·$(dT)_{12-18}$	(3'-5')-Polymer von Riboadenosinmonophosphat assoziiert mit einem Oligomer aus 12 bis 18 Desoxythymidinmonophosphatbausteinen
aktivierte DNS	DNS, die mit DNase I behandelt wurde
mm	Millimeter
cm	Zentimeter
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
nmol	Nanomol(10^{-9} Mol)
µM	Mikromolar (Mikromol/Liter)

mM	Millimolar (Millimol/Liter)
M	Molar (Mol/Liter)
V	Volt
W	Watt
Bq	Becquerel (2.7×10^{-11} Curie)
Ci	Curie (2.22×10^{-12} radioactive Zerfälle pro Minute)
g	Erdbeschleunigung ($9.81\ m\ s^{-2}$)
S	Svedberg'sche Sedimentationskonstante (10^{-13}s)
s	Sekunden
min	Minuten
h	Stunden
cpm	die vom Szintillationsgerät gezählten radioaktiven Zerfälle pro Minute
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
^{o}C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozente
%	Prozente
K_m	Michaeliskonstante
UV	Ultraviolettes Licht
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
DEAE	Diaethylaminoaethyl
DTT	Dithiothreitol

1. EINLEITUNG

1.1. DNS-SYNTHESE

Die DNS-Synthese dient der Erhaltung der genetischen Information im Zellkern. Es wird zwischen replikativer und reparativer DNS-Synthese unterschieden. Für beide Arten ist eine Vielzahl von Enzymen nötig; unter diesen fällt den DNS-Polymerasen die Aufgabe zu, die Bausteine der DNS miteinander zu verknüpfen.

1.1.1. DNS-Replikation

Bei der DNS-Replikation wird das im Kern enthaltene genetische Material, die DNS, verdoppelt. Dies ist eine der Voraussetzungen für die Zellteilung. Aus jeder DNS-Doppelhelix entstehen dabei zwei identische Kopien. Die Hauptaufgabe in dieser Verdoppelung übernehmen die DNS-Polymerasen. Sie polymerisieren Desoxyribonukleosidtriphosphate zu einem DNS-Strang. Dazu brauchen die Polymerasen neben einer sog. Matrize (d.h. einer Vorlage) einen komplementären Starterstrang, an welchen die Nukleotidbausteine polymerisiert werden können. Damit diese Polymerisation ablaufen kann, entfaltet sich vorher der DNS-Doppelstrang und bildet eine sog. Replikationsgabel, die kontinuierlich wandert.

1.1.2. DNS-Reparatur

Es lassen sich zwei Arten von Reparatur unterscheiden :

a) Die postreplikative Reparatur erfolgt unmittelbar im Anschluss an die DNS-Replikation. Sie korrigiert die Ablesungsfehler, welche während der DNS-Verdoppelung gemacht wurden.

b) Die unprogrammierte Reparatur erfolgt unabhängig vom Zellzyklus und bessert diejenigen Schäden aus, die durch Umwelteinflüsse, wie UV-Licht, radioaktive Strahlung und chemische Mutagene entstanden sind. Die defekten Stellen werden enzyma-

tisch herausgeschnitten und durch DNS-Polymerasen mit richtig gepaarten Nukleotiden wieder aufgefüllt.

1.2. FUNKTIONEN DER DNS-POLYMERASEN

Die genaue Funktion der drei eukaryontischen DNS-Polymerasen α, β und γ (Bollum, 1975; Weissbach, 1977; Falaschi und Spadari, 1978) war bis vor kurzer Zeit weitgehend unbekannt. Es liess sich nämlich nicht entscheiden, welches Enzym für die Replikation und welches für die Reparatur zuständig ist. Dies ist dem Mangel an Mutanten, denen die eine oder andere DNS-Polymerase fehlt, zuzuschreiben. Daher stützte sich das Verständnis der Funktionen der DNS-Polymerasen weitgehend auf Indizienbeweise.

1.2.1. DNS-Polymerase α

Trotz der eingangs erwähnten Einschränkungen wurden in den letzten Jahren einige Fortschritte im Verständnis der Funktion der α-Polymerase erzielt. Mehrere Indizien sprechen für eine aktive Beteiligung dieses Enzyms an der DNS-Replikation.

So besteht eine gute Korrelation zwischen der Aktivität der α-Polymerase und der DNS-Replikationsrate in allen daraufhin untersuchten Zellen und Geweben : in L-Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Chang et al., 1973d), in BHK-Zellen (Craig et al., 1975), in Lymphozyten nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (Coleman et al., 1974; Mayer et al., 1975; Bertazzoni et al., 1976), in synchronisierten HeLa-Zellen während der S-Phase* (Spadari und Weissbach, 1974c; Chiu und Baril, 1975), in der

---

* Der Zellzyklus wird eingeteilt in die vier Phasen M, G_1, S, G_2.
M = Mitosephase,
G_1= Phase, in der die Zelle einen diploiden DNS-Gehalt aufweist,
S = Phase, in der die DNS-Synthese stattfindet,
G_2= Phase, in der die Zelle einen tetraploiden DNS-Gehalt aufweist.

regenerierenden Rattenleber (Chang und Bollum, 1972; Baril et al., 1973; William et al., 1975), in der Milz nach Stimulation mit Antigen oder Erythropoetin (Bollum, 1975; Roodman et al., 1976), wie auch während der normalen in vivo Differenzierung des Gehirns (Chiu und Sung, 1972; Hübscher et al., 1977a), der Milz (Hübscher et al., 1977a) und des Herzmuskels (Claycomb, 1975; Hübscher et al., 1977a).

Das α-Enzym ist als einzige DNS-Polymerase fähig, in vitro einen RNS-Starterstrang durch einen DNS-Strang zu verlängern (Spadari und Weissbach, 1975). Da man annimmt, dass auch in vivo ein RNS-Stück als Starter gebraucht wird, legt diese Eigenschaft der α-Polymerase ihre Beteiligung an Replikationsvorgängen nahe (Reichard et al., 1974; Edenberg und Huberman, 1975; Waqar und Huberman, 1975; Anderson et al., 1977; Tseng und Goulian, 1977; Eliasson und Reichard, 1978; Kaufmann et al., 1978).

Ein weiteres Indiz liefert die Beobachtung, dass die DNS-Polymerase α spezifisch stimuliert wird durch Proteine, welche als Stabilisatoren der Replikationsgabel angesehen werden (Herrick et al., 1976; Alberts und Sternglanz, 1977; Otto et al., 1977).

Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass von den drei DNS-Polymerasen insbesondere die α-Polymerase assoziiert ist mit replizierenden SV 40 Chromosomen (Waqar et al., 1977; Edenberg et al., 1978; Fanning et al., 1978). Am gleichen Chromosom (Edenberg et al., 1978) und in lysierten HeLa-Zellen (Waqar et al., 1978) ist ausserdem die replikative DNS-Synthese in jeder Hinsicht resistent gegen einen spezifischen Inhibitor der β- und γ-Polymerase, das 2'-3'-Didesoxythymidin-5'-Triphosphat.

Im Gegensatz dazu hemmt das Antibiotikum Aphidicolin, ein selektiver Blocker der α-Polymerase, in Seeigelembryonen die Mitose. Diese setzt eine replikative DNS-Synthese voraus. Auf die Meiose jedoch des Seesterns, die von der DNS-Synthese unabhängig ist, hat Aphidicolin keinen Einfluss (Susumu et al., 1978).

Das letzte Indiz endlich für die Identifizierung der DNS-Poly-

merase α als replizierendes Enzym leitet sich vom Vergleich der Polymerisationsgeschwindigkeiten ab, die einerseits bei der Replikation in vivo gemessen, anderseits für die einzelnen DNS-Polymerasen in vitro bestimmt wurden. Bei dieser Gegenüberstellung findet man, dass das zur Zeit verfügbare, reinste α-Polymerase-Präparat mit einer Geschwindigkeit arbeitet, die dem in vivo-Wert am nächsten kommt. Die β-Polymerase hingegen synthetisiert um vieles langsamer und könnte somit die Wanderung der Replikationsgabel nicht mit der nötigen Geschwindigkeit aufrecht erhalten (Edenberg und Huberman, 1975; Falaschi und Spadari, 1978).

Die Gesamtheit dieser Beobachtungen spricht in hohem Masse dafür, dass die DNS-Polymerase α das replizierende Enzym des Zellkerns ist.

1.2.2. DNS-Polymerase β

Im Gegensatz zur Funktion der DNS-Polymerase α herrschte über die physiologische Rolle der β-Polymerase bis vor kurzem noch weitgehende Unklarheit. Sie wurde häufig als Reparaturenzym bezeichnet, mehr weil in Anlehnung an das bakterielle System der Bedarf eines solchen bestand, als aufgrund solider, experimenteller Ergebnisse. Ein guter Hinweis für diese Funktion stammt von Bertazzoni et al. (1976). Er fand, dass nach Stimulation von Lymphozyten mit Phytohämagglutinin der Anstieg der β-Polymerase mit dem Optimum der DNS-Reparatur koinzidiert; während der DNS-Replikation bleibt jedoch diese Enzymaktivität minimal.

In einem künstlich zusammengesetzten System wurde kürzlich gezeigt, dass die β-Polymerase bereits vorhandene Startersequenzen in mitochondrialer DNS verlängern kann (Eichler et al., 1977). Dies sagt jedoch wenig über die in vivo Funktion dieses Enzyms aus, da die β-Polymerase im Kern lokalisiert ist und daher nicht in die Replikation mitochondrialer DNS eingreifen kann.

Unlängst brachten Hübscher et al. (1978, 1979) Licht in diese Angelegenheit, indem sie isolierte Neuronenkerne als Testsystem

verwendeten. Dabei wurden die folgenden Befunde erhoben :

1. 60 Tage nach Verlust der Teilungsfähigkeit enthalten Kerne von Neuronen beinahe ausschliesslich die β-Polymerase (99.2%), während die γ-Polymerase nur spurenweise vorhanden ist (0.8%) und die α-Polymerase fehlt.

2. Nach Schädigung der Kern-DNS durch UV-Bestrahlung ist der Einbau von radioaktiv markiertem Desoxythymidintriphosphat sieben- bis zehnfach erhöht gegenüber nicht-bestrahlten Kontrollen.

Daraus schlossen sie, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit die DNS-Polymerase β das Reparaturenzym im Kern ist.

1.2.3. DNS-Polymerase γ

Was die Funktion dieses Enzyms anbelangt, tappte man ebenfalls bis vor kurzem im dunkeln. Man wusste, dass die γ-Polymerase die einzige DNS-Polymerase in Mitochondrien ist (Bolden et al., 1977; Bertazzoni et al., 1977; Hübscher et al., 1977b) und schrieb ihr deshalb eine Rolle in der Synthese der mitochondrialen DNS zu.

Auch in diesem Problemkreis schafften Hübscher et al. (1978, 1979) Klarheit. Sie studierten die γ-Polymerase in sog. Synaptosomen. Beim Homogenisieren von Hirngewebe werden die synaptischen Endigungen vom Axon abgeschert. Die durch die Präparation eröffnete Membran der Synapse schliesst sich wieder. Die neu entstandene Organelle wird als Synaptosom bezeichnet. Zwei Vorteile zeichnen die Synaptosomen aus :

1. Synaptische Endigungen sind im Gehirn vom Zellkern anatomisch getrennt. Dadurch ist die Gefahr einer Kontamination mit nukleären DNS-Polymerasen während der Isolierung sehr gering.

2. Die Synaptosomen enthalten Mitochondrien. Diese sind nicht nackt, sondern von einer Membran und von Zytoplasma umgeben. Dadurch bleiben sie während der Präparation völlig intakt und die Vorgänge in ihnen können sozusagen in der natürlichen Umgebung ablaufen.

Biochemisch und elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die DNS-Synthese in synaptosomalen Mitochondrien replikativer Natur ist.

Daraus und aus der oben erwähnten Tatsache, dass in Mitochondrien nur die DNS-Polymerase γ vorkommt, folgerten sie, dass die DNS-Replikation in den Mitochondrien der γ-Polymerase zuzuschreiben ist.

2. PROBLEMSTELLUNG

Das Interesse an den neuronalen DNS-Polymerasen entwächst der Beobachtung einer DNS-Zunahme in den Neuronen der Grosshirnrinde während der frühen postnatalen Entwicklung. Diese erfolgt aufgrund einer vom Zellzyklus unabhängigen, replikativen DNS-Synthese (Bregnard et al., 1975, 1977; Kuenzle et al., 1978). Deshalb wurde versucht, einen Ueberblick über die Enzymologie der neuronalen DNS-Synthese zu erarbeiten. Dabei interessierten speziell die drei DNS-Polymerasen α, β und γ. In einem ersten Schritt wurde die mitochondriale DNS-Polymerase aus synaptischen Endigungen analysiert und gezeigt, dass sie mit der DNS-Polymerase γ aus Neuronenkernen identisch ist (Hübscher et al., 1977b).

Aufgabe dieser Arbeit war es, in einem zweiten Schritt die enzymologische Studie auf die DNS-Polymerase β auszudehnen und Vergleiche mit β-Polymerasen aus anderen Geweben und Zellen zu ziehen.

3. MATERIAL

3.1. TIERMATERIAL

Vom Institut für Zuchthygiene wurden SIV-50-Ratten im Alter von 7 bis 15 Tagen bezogen.

3.2. CHEMIKALIEN

Nicht markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate und Kalbsthymus-DNS wurden von Calbiochem (Luzern, Schweiz) bezogen; DNase I (aus Rinderpankreas) war von Worthington Biochemicals Corp. (Freehold, N.J.). β-Polymerase aus HeLa-Zellen (600 Einheiten/mg) war ein Geschenk von Dr. G. Pedrali-Noy, Pavia, Italien. Poly(A), Poly (dA), $(dT)_{12-18}$ und doppelsträngige DNS-Zellulose erhielten wir von P-L Biochemicals (Milwaukee, Wis.) und Poly(dA-dT) war von Boehringer (Mannheim, Deutschland). DEAE-Zellulose und Phosphozellulose stammten von Whatman. [^{3}H]dTTP war vom Radiochemical Centre (Amersham, U.K.); Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden) belieferte uns mit Sephadex G-100, LKB (Bromma, Schweden) mit Ampholinen, Eastman Kodak mit Akrylamid und N,N'-Methylenbisakrylamid. Die folgenden Proteine wurden als Sedimentations- und Molekulargewichtsmarker gebraucht : Cytochrom c aus Pferdeherz und Rinderserumalbumin von Fluka (Buchs, Schweiz), Rinderhämoglobin von Pentex Inc. (Kankakee, Ill.) und Leberkatalase vom Rind von Sigma (St. Louis, Mo.). N-Aethylmaleinimid wurde von Sigma bezogen und die Bio Rad Laboratorien lieferten das Reagens für die Proteinbestimmung. Alle übrigen Chemikalien waren Handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad.

3.3. APPARATE

Folgende Apparate wurden verwendet :

- Präparative Ultrazentrifuge Beckman L2-65 B
- Kühlzentrifuge Sorvall RC 2B
- Spektrophotometer Beckman ACTA C III
- Szintillationsmessgerät Packard Tri Carb 3380
- Ultraschallgerät Branson B 12 mit Mikrospitze
- Spannungs- und Stromspeisegerät Buchler 3-1014 A
- Ultrafiltrationszelle Amicon, Modelle 52 und 402, mit Membran P 10.

4. METHODEN

4.1. HERSTELLUNG VON MATRIZEN

Die Matrizen/Starter Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$ und Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ wurden nach der Beschreibung von Spadari und Weissbach (1974b) in einem Basenverhältnis von 5:1 hybridisiert. Aktivierte Kalbsthymus-DNS (Hübscher et al., 1977a) und hitzedenaturierte DNS (Stalker et al., 1976) wurden nach publizierten Methoden zubereitet.

4.2. DNS-POLYMERASE-BESTIMMUNG

Der Ansatz für die routinemässige Bestimmung der DNS-Polymerase enthielt in 0.1 ml:30 µg aktivierte DNS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 µM dATP, dGTP, dCTP, 21 µM [^{3}H]dTTP (10^4 Bq, entsprechend 0.27 µCi), 8 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1 M KCl und 0.5 mg/ml Rinderserumalbumin. Für die Charakterisierung des gereinigten Enzyms wurde eine Endkonzentration von 0.075 µg Protein pro Bestimmung eingesetzt, ausgenommen zur Ermittlung der Michaeliskonstante, bei der 0.15 µg Protein verwendet wurde.

Zur Bestimmung der β-Polymerase wurde bei 37° C während 30 min inkubiert. Unter diesen Bedingungen verlief die Reaktion linear (vgl. Abb. 9). Die säureunlösliche Radioaktivität wurde nach Bollum (1968) bestimmt.

Zur Bestimmung der Matrizen-Bevorzugung wurde das übliche Reaktionsgemisch gebraucht, mit dem Unterschied, dass alle Matrizenkonzentrationen auf 5 µg gesenkt wurden.

Die Fähigkeit des Enzyms, Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ als Matrize/Starter zu gebrauchen, wurde nach der in Tabelle 3 beschriebenen Methode geprüft.

Die DNS-Polymerasen α und γ wurden mit beschriebenen Methoden nachgewiesen (Hübscher et al., 1977a).

4.3. 3'-5'-EXONUKLEASE-NACHWEIS

Dieser wurde nach der Beschreibung von Brutlag und Kornberg (1972) ausgeführt.

4.4. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

Sie wurde, wie von Andrews (1965) beschrieben, auf einer Sephadex G-100-Säule ausgeführt. Dabei dienten Cytochrom c, Ovalbumin und Rinderserumalbumin als Molekulargewichtsmarker.

4.5. SEDIMENTATIONSANALYSE IN GLYCERINGRADIENTEN

Das gereinigte Enzym wurde in 0.1 bis 0.2 ml 20 ml Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin und 1 mg/ml Rinderserumalbumin aufgenommen und auf einen 10 bis 30% (v/v) Glyceringradienten in 4.0 ml desselben Puffers geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einem Spinco SW 50.1-Rotor bei

40 000 Umdrehungen/min während 17 h bei 0°C. Anschliessend wurden Fraktionen vom Boden des Röhrchens her gesammelt und auf Polymerase-Aktivität untersucht. Der Sedimentationskoeffizient wurde nach Martin und Ames (1961) berechnet unter Verwendung folgender Standard-Proteine : Ovalbumin (3.6 S), Hämoglobin (4.1 S) und Leberkatalase vom Rind (11.3 S).

4.6. ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG IN POLYAKRYLAMIDGELEN

Rundgele (0.5 x 10 cm) wurden im wesentlichen nach der Beschreibung von Davies (1971) zubereitet. Die Gele wurden mit 0.2 ml gereinigter β-Polymerase beladen und während einigen Stunden bei 2-4°C fokussiert. Die Trennung wurde als beendigt betrachtet wenn Cytochrom c, welches als Markerprotein in einem zweiten Gel mitlief, zum Stillstand kam. Die Anfangsspannung betrug 200 V, innerhalb 90 min wurde sie schrittweise auf 350 V erhöht. Die Gele wurden sorgfältig aus den Röhrchen genommen, auf einer Glasplatte bei -20°C während 30 min eingefroren und anschliessend in Scheiben von 2.5 mm Dicke zerschnitten. Diese wurden dann über Nacht in 0.25 ml folgenden Extraktionspuffers ausgelaugt : 0.2 M Kaliumphosphat (pH 7.5), 15 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 20% (v/v) Glycerin, 0.1% Nonidet P40, 1 mg/ml Rinderserumalbumin. Von jeder Fraktion wurden 30 µl auf DNS-Polymerase β-Aktivität geprüft. Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurden Stücklein eines anderen Gels, das gleichzeitig fokussiert worden war, in 1.1 ml quarzdestilliertes Wasser gegeben, um die Ampholine während einer Stunde herausdiffundieren zu lassen. Der pH wurde anschliessend mittels einer Glaselektrode gemessen.

4.7. PROTEINBESTIMMUNG

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Eine Ausnahme bildete die Bestimmung nach dem letzten Reinigungsschritt; dabei gelangte der empfindlichere Test von Bio Rad, nach Angaben des Herstellers, zur Anwendung.

4.8. PRAEPARATION NEURONALER ZELLKOERPER

Durch Dekapitation wurden 1089 Ratten getötet. Die Gehirne wurden in der Kälte entnommen und die Hirnrinden präpariert. Es wurden jeweils 20 Cortices miteinander zerkleinert und die neuronalen Zellkörper nach der Methode von Sellinger et al. (1971) isoliert. Diese wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

4.9. ISOLIERUNG DER DNS-POLYMERASE β

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 zusammengefasst und werden im folgenden detailliert beschrieben. Alle Schritte wurden bei 0 bis 4°C ausgeführt.

4.9.1. Extraktion des Enzyms aus dem Gewebe

Alle Präparate neuronaler Zellkörper wurden aufgetaut und zusammen suspendiert in 125 ml 10 mM Kaliumphosphat (pH 7.5), 1.5 mM $MgCl_2$ und 0.5 mM DTT. Durch Zugabe von 92 ml 1 M Kaliumphosphat (pH 7.5), 1.25 mM DTT und 1% (v/v) Triton X-100, wurde die Extraktion eingeleitet. Das Volumen wurde dann, unter Konstanthaltung aller Konzentrationen, auf 405 ml erhöht. Portionen zu 35 ml wurden zweimal während 25 sec mit der Mikrospitze des Ultraschallgerätes bei einer Leistung von 50 W beschallt. Die so gewonnenen Extrakte wurden bei 20 000 xg während 30 min in einem Sorvall HB-4 Ausschwingrotor zentrifugiert und die Ueberstände vereint (392 ml).

4.9.2. Beseitigung von Nukleinsäuren durch DEAE-Zellulose-Filtration

Die vereinten Fraktionen von 4.9.1. wurden auf eine DEAE-Zellulose-Säule (4.5 x 7 cm) geladen, die vorher mit 0.4 M Kaliumphosphat (pH 7.5), 0.5 mM DTT äquilibriert worden war. Die Elution wurde mit 4 bis 5 Säulenvolumen des Aequilibrierpuffers erwirkt, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 ml/h. Das gesamte Eluat

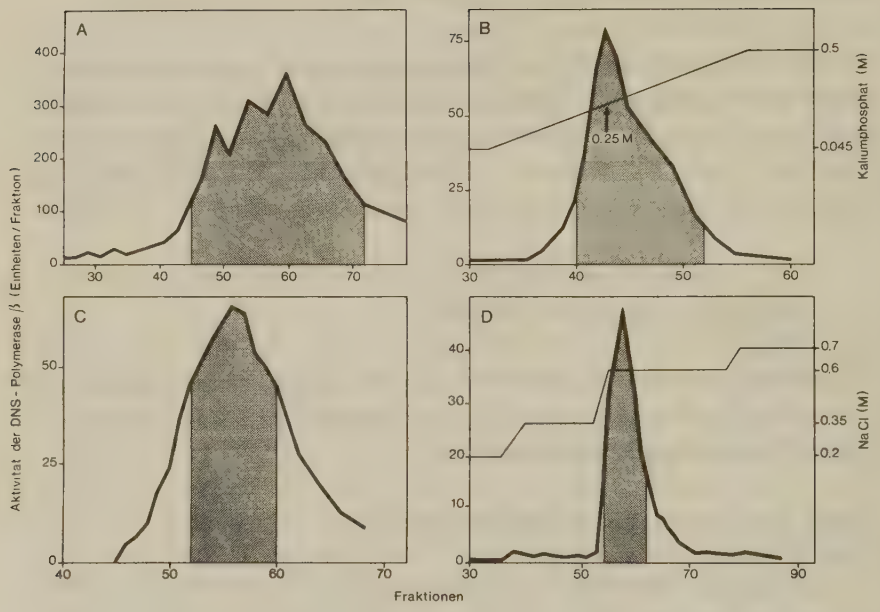

Abbildung 1 - Reinigung der DNS-Polymerase β

Die Reinigung gliederte sich in vier aufeinanderfolgende Chromatographien, je eine auf DEAE-Zellulose (A), Phosphozellulose (B), Sephadex G-100 (C) und nativer DNS-Zellulose (D). Die Fraktionen wurden, wie im methodischen Teil beschrieben, auf ihre β-Polymerase-Aktivität untersucht. Die schattierten Flächen stellen die gesammelten und vereinten Fraktionen dar.

(860 ml) wurde in einer Ultrafiltrationszelle auf ein Volumen von 260 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde dialysiert gegen insgesamt 40 l 45 mM Kaliumphosphat (pH 7.5), 0.5 mM DTT und bei 16 000 xg während 20 min im Sorvall HB-4 Rotor zentrifugiert.

Tabelle 1 - Reinigung der DNS-Polymerase β

Im Schritt 5 wurde Rinderserumalbumin zusammen mit der Probe auf die Säule geladen. Es erschien im Eluat kurz vor dem Enzym und wirkte sich in der Proteinbestimmung störend aus. Deshalb wurde das Protein in diesem Schritt nicht bestimmt (n.b.).

Schritt	Gesamtprotein mg	Gesamtaktivität Einheiten	Spezifische Aktivität Einheiten/mg
1. Extraktion	4271	11600	2.7
2. DEAE-Zellulose-Filtration	2634	7400	2.9
3. DEAE-Zellulose-Chromatographie	112	9400	56
4. Phosphozellulose-Chromatographie	6.7	660	100
5. Sephadex G-100-Chromatographie	n.b.	600	n.b.
6. Native DNS-Zellulose-Chromatographie	0.22	300	1370

4.9.3. DEAE-Zellulose-Chromatographie (Abb. 1A)

Der Ueberstand von 4.9.2. wurde auf eine DEAE-Zellulose-Säule (7 x 24 cm) geladen, die vorher mit 45 mM Kaliumphosphat (pH 7.5), 0.5 mM DTT äquilibriert worden war. Es wurde mit 2 Säulenvolumen des gleichen Puffers bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 102 ml/h eluiert. Fraktionen zu 20 ml wurden gesammelt und auf β-Polymerase-Aktivität untersucht. Die Pik-Fraktionen wurden vereint (560 ml).

4.9.4. Phosphozellulose-Chromatographie (Abb. 1B)

Die vereinten Fraktionen aus 4.9.3. wurden auf eine Phosphozellulose-Säule (2.7 x 6 cm) geladen, die vorher mit demselben Puffer äquilibriert worden war. Mit 75 ml Aequilibrierpuffer wurde gewaschen und dann mit einem linearen Gradienten von 0.045 bis

0.5 M Kaliumphosphat (pH 7.5), 0.5 mM DTT bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 56 ml/h eluiert. Fraktionen zu 3.5 ml wurden gesammelt, je 0.1 ml für die Proteinbestimmung sofort abgezweigt und zum Rest 1 ml Rinderserumalbumin (6 mg/ml) gegeben. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden vereint (59 ml) und in einer Ultrafiltrationszelle auf 8 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde dreimal gegen je 1.5 l 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 M NaCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin dialysiert.

4.9.5. Gelfiltration auf Sephadex G-100 (Abb. 1C)

Das Dialysat aus 4.9.4. wurde auf eine Sephadex G-100-Säule (2.5 x 95 cm) geladen. Eluiert wurde mit 400 ml des gleichen Dialysepuffers. Dabei betrug die Durchflussgeschwindigkeit 20 ml/h. Fraktionen zu 4.7 ml wurden gesammelt und je 0.1 ml für die Proteinbestimmung abgezweigt. Zum Rest wurde sofort 1 ml Rinderserumalbumin (6 mg/ml) gegeben. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden vereint (47 ml).

4.9.6. Affinitätschromatographie auf nativer DNS-Zellulose (Abb. 1D)

Die vereinten Fraktionen wurden auf eine native DNS-Zellulose-Säule (1.2 x 2.7 cm) geladen und mit 50 ml des unter 4.9.5. verwendeten Puffers gewaschen. Die Elution wurde mit einem Stufengradienten durchgeführt. Dieser bestand aus 30 ml 0.35 M NaCl, 45 ml 0.6 M NaCl und 40 ml 0.7 M NaCl im selben Puffer. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 17.6 ml/h. Fraktionen zu 1.5 ml wurden gesammelt, je 0.05 ml für die Proteinbestimmung abgezweigt und zum Rest wurde 0.1 ml Rinderserumalbumin (18 mg/ml) gegeben. Diejenigen Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden vereint (14 ml), auf eine Glycerinkonzentration von 50% (v/v) gebracht und bis zur Charakterisierung bei -70°C tiefgefroren.

5. RESULTATE UND DISKUSSION

Die Eigenschaften der gereinigten neuronalen DNS-Polymerase sind in Tabelle 2 zusammengefasst und mit Literaturdaten über β-Polymerasen aus anderen Geweben und Zellen verglichen. Daraus geht hervor, dass alle bis jetzt charakterisierten β-Polymerasen bezüglich ihrer enzymologischen und physikochemischen Eigenschaften im wesentlichen identisch sind.

5.1. CHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN

Wie andere β-Polymerasen (Baril et al., 1971; Chang, 1973a; Sedwick et al., 1972; Tsuruo und Hirayama, 1975) haftete auch das neuronale Enzym nicht an der DEAE-Zellulose und wurde schon bei geringer Ionenstärke abgelöst (Abb. 1A). Von der Phosphozellulose wurde das Enzym mit 0.25 M Kaliumphosphat eluiert (Abb. 1B). Dies stimmt gut überein mit den Literaturwerten, die zwischen 0.22 und 0.27 M liegen (Chang und Bollum, 1971b; Chang, 1973a; Weissbach et al., 1971; Sedwick et al., 1972; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977). Bei der Chromatographie auf nativer DNS-Zellulose wurde die β-Polymerase mit 0.6 M NaCl wiedergewonnen. Der von Stalker et al. (1976) beschriebene Wert beträgt 0.56 M.

5.2. MOLEKULARGEWICHT

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration bestimmt und beträgt 51 000 (Abb. 2). Die Literaturangaben bewegen sich zwischen 40 000 und 65 000 (Berger et al., 1971; Haines et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b; Chang, 1973a; Spadari et al., 1974a; Wang et al., 1974; Roufa et al., 1975; Suzuki-Hori et al., 1977). Die einzige Ausnahme hievon bildet die β-Polymerase aus Novikoff-Hepatomzellen mit einem Molekulargewicht von 31 000 bis 32 000 (Stalker et al., 1976).

Tabelle 2 - Eigenschaften der neuronalen DNS-Polymerase β und Vergleich mit Literaturdaten von β-Polymerasen aus anderen Geweben und Zellen

Eigenschaften	Rattenneuronen	Rattenleber	Kalbsthymus	Kaninchen-knochenmark	KB-Zellen	HeLa-Zellen	Novikoff-Hepatomzellen	Xenopus laevis-Ovarien	Seeigel
Molekulargewicht	51000	49000 (9)* 65000 (39)	45000 (21)	40-50000 (19)	43000 (77)	45000 (64)	31-32000 (69)	45000 (47)	50000 (71)
Sedimentationskoeffizient	3.3	3.5 (9)	3.4 (22)	3.4 (19)	--	3.3 (64)	3.3 (55)	3.5 (47)	3.0 (71)
Isoelektrischer Punkt	8.3		9.5 (13)	9.5 (13)	9.2 (61)	--	8.5 (69)	--	8.1 (71)
Resistenz gegen Sulfhydryl-gruppenblocker	ja	ja (39)	ja (13)	ja (13)	ja (61)	ja (79)	ja (69)	ja	ja (71)
pH-Optimum	9.0	7.4-8(9); 9.0(7)	9.0 (21)	8.6 (19)	9.2 (61)	9.0 (79)	8.4 (69)	8.7-9.1 (47)	9-9.5 (71)
Optimale Konz. (mM) von Na^+	25-50	25-50 (39)	40-200 (21)	--	--	--	50-100 (69)	100 (47)	30-60 (71)
K^+	100-250	--	40-200 (21)	--	200 (61)	--	50-100 (69)	100 (47)	--
Mg^{2+}	25	10-15 (7)	6-12 (21)	5-20 (19)	20 (61)	15-25 (79)	5-10 (69)	5 (47)	5-10 (71)
Mn^{2+}	0.3	--	0.2-0.8 (13)	0.3-0.6 (19)	--	--	1 (69)	0.4-0.8 (47)	1-2 (71)
Matrizen-Bevorzugung (in Anwesenheit von Mg^{2+})	Poly(dA-dT)> Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$> aktivierte DNS	Poly(dA-dT) > aktivierte DNS (9)	Exonuklease III-behandelte DNS > aktivierte DNS(21)	--	aktivierte DNS > Poly(dA-dT)> Exonuklease III-behandelte DNS (61)	aktivierte DNS > Poly(dT)·$(A)_{12-18}$ >> Poly(dT)·$(dA)_{12-18}$ (65)	Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$ > Poly(dA-dT)> Poly(dA)·Poly(dT)> aktivierte DNS (69)	Poly(dC)·$(dG)_{12-18}$ Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$> aktivierte DNS > Poly(dT)·$(A)_{15-24}$ (47)	Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$> aktivierte DNS > Poly(dA-dT) (71)
Fähigkeit zum Lesen von Poly(A)·(dT)	ja	ja (25)	ja (25)	ja (19, 25)	ja (78)	ja (Tab. 3)	ja (69)	ja (47)	ja (71)
K_m (µM)	16.5	--	9.7-13.9 (23)	--	160 (61)	8-12 (65)	7-8 (69)	10-15 (47)	5 (71)
Fähigkeit z.Einbau eines einzelnen Desoxyribonukleosidtriphosphates (% des Einbaus mit allen 4 Triphosphaten in 30 min)	80	50 (39)	12 (21)	ja (19)	30 (77)	10-20 (79)	37.3 (69)	--	21 (71)
3'-5'-Exonuklease-Aktivität	keine	keine (9, 13)	keine (22)	keine (19)	keine (61, 77)	--	keine (69)	keine (47)	--

* Der Uebersichtlichkeit halber sind in dieser Tabelle anstelle der Autorennamen die Nummern der entsprechenden Zitate im Literaturverzeichnis angegeben.

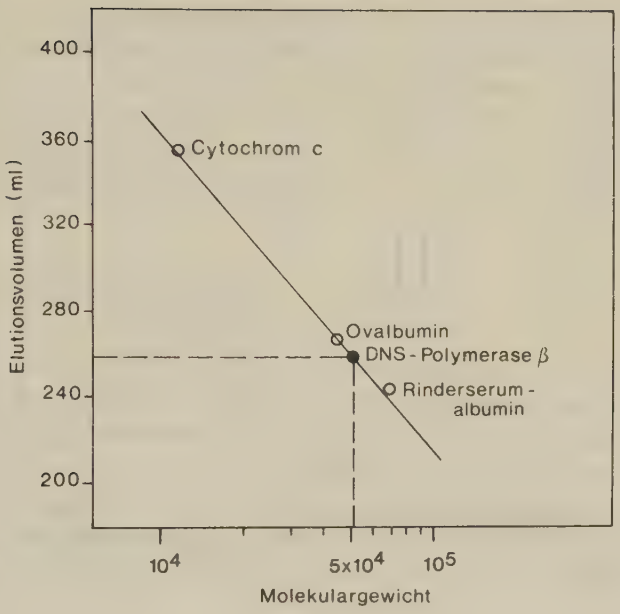

Abbildung 2 - Molekulargewicht der DNS-Polymerase β

Die Bestimmung durch Gelfiltration auf Sephadex G-100 ergab ein Molekulargewicht von 51 000. Cytochrom c (12 800), Ovalbumin (43 500) und Rinderserumalbumin (66 000) dienten als Molekulargewichtsmarker.

5.3. SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENT

Aus der Zentrifugation in Glyceringradienten wurde ein Sedimentationskoeffizient von 3.3 S ermittelt (Abb. 3). Dieser Wert stimmt gut überein mit Literaturangaben von 3.0 bis 3.5 S (Berger et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b, 1973c, 1973d; Smith und Gallo, 1972; Spadari et al., 1974a; Hecht, 1975; Tsuruo und Hirayama, 1975; Hirai und Watanate, 1976; Hübscher et al., 1977a; Mosbough

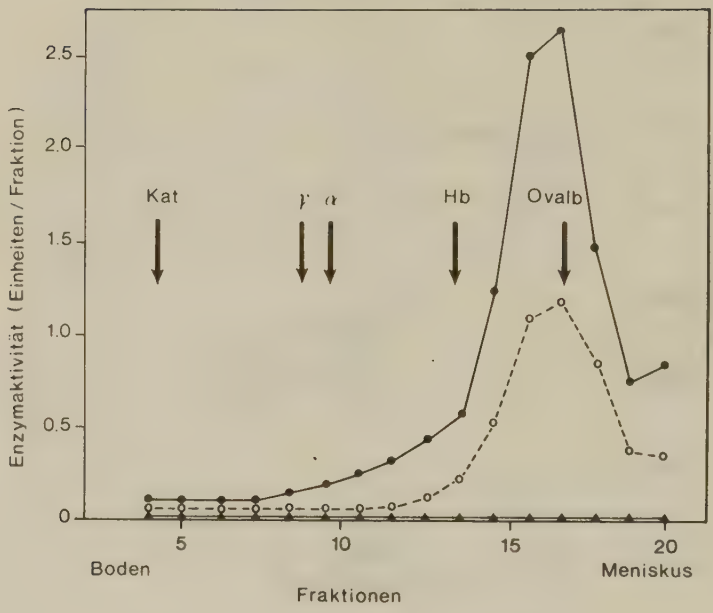

Abbildung 3 - Sedimentationskoeffizient der DNS-Polymerase β

Die Bestimmung durch Zentrifugation in Glyceringradienten ergab 3.3 S Ovalbumin (Ovalb, 3.6 S), Hämoglobin (Hb, 4.1 S) und Katalase (Kat, 11.3 S), die gleichzeitig in einem andern Gradienten liefen, dienten als Sedimentationsmarker. Diejenigen Fraktionen, in denen die DNS-Polymerase α (8.0 S) und γ (9.2 S) zu erwarten wären, sind mit Pfeilen bezeichnet. Diese Sedimentationskoeffizienten wurden aufgrund früherer Bestimmungen (Hübscher et al., 1977a, b) berechnet. Die DNS-Polymerase-Aktivitäten wurden mit 10 µl jeder Fraktion im üblichen β-Polymerase-Ansatz (●——●) und in den Ansätzen für α- (o--- o) und γ-Polymerase (▲——▲) bestimmt. Die Enzymaktivität bei 3.3 S im α-Ansatz ist der Tatsache zuzuschreiben, dass die DNS-Polymerase β mit 30% Wirksamkeit auf den α-Nachweis anspricht (Hübscher et al., 1977a).

et al., 1977; Suzuki-Hori et al., 1977). Zusätzlich konnte mit diesem Gradienten gezeigt werden, dass das gereinigte Präparat frei war von kontaminierenden DNS-Polymerasen α und γ. Mit den empflindlichen Nachweismethoden (Hübscher et al., 1977a) waren nämlich diese Enzymaktivitäten in den entsprechenden Fraktionen des Gradienten nicht zu finden.

5.4. ISOELEKTRISCHER PUNKT

Das Mittel aus 5 Bestimmungen ergab einen isoelektrischen Punkt bei pH 8.3. Cytochrom c, das parallel zur β-Polymerase in einem Kontrollgel fokussiert wurde, bandete bei pH 9.6 (der isoelektrische Punkt von Cytochrom c wird mit pH 9.4 angegeben, Righetti und Caravaggio, 1976). Die für andere β-Polymerasen bestimmten Werte bewegen sich zwischen 8.1 und 9.5 (Sedwick et al., 1972; Bollum, 1975; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977).

5.5. RESISTENZ GEGEN SULFHYDRYLGRUPPENBLOCKER

Abb. 4 zeigt den Einfluss von N-Aethylmaleinimid auf die neuronale β-Polymerase. Bei einer Konzentration von 10 mM war die Aktivität leicht erniedrigt; sie betrug noch 85% des Wertes, der ohne Hemmstoff gemessen wurde. Diese geringe Empfindlichkeit liegt zwischen den beiden in der Literatur beschriebenen Extremen. Einerseits wird über eine vollständige Resistenz der meisten β-Polymerasen berichtet (Haines et al., 1971; Weissbach et al., 1971; Sedwick et al., 1972; Bollum, 1975; Suzuki-Hori et al., 1977), andererseits scheint das Enzym aus Novikoff-Hepatomzellen bei gleicher Hemmstoffkonzentration nur zu 65% resistent zu sein (Stalker et al., 1976).

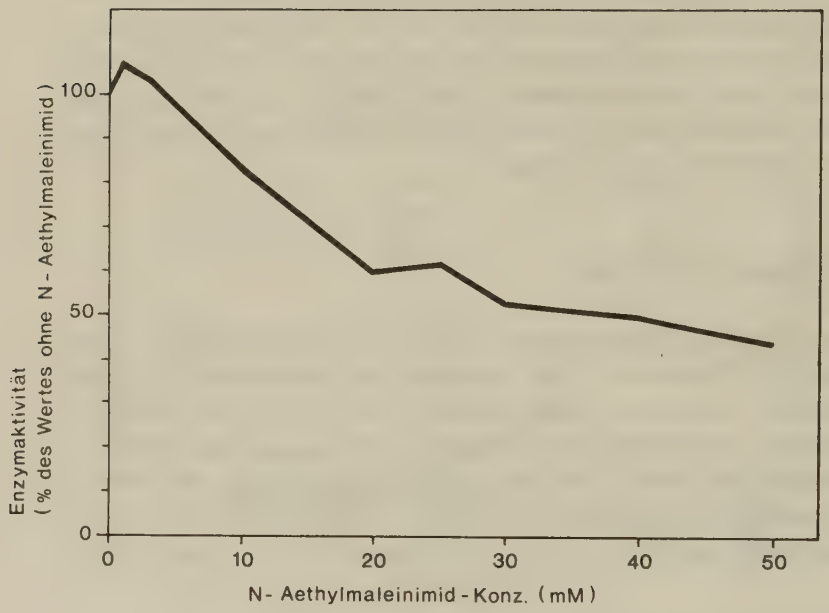

Abbildung 4 - Resistenz der DNS-Polymerase β gegen N-Aethylmaleinimid

5.6. ABHAENGIGKEIT VOM pH

Aus Abb. 5 geht die pH-Abhängigkeit der β-Polymerase hervor. Das pH-Optimum lag bei 9.0 und somit im allgemein anerkannten Bereich von 8.4 bis 9.5 (Baril et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b; Chang, 1973a; Weissbach et al., 1971; Sedwick et al., 1972; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977). Die einzige Ausnahme macht der von Berger et al. (1971) mitgeteilte Wert von pH 7.4 bis 8.0 für die β-Polymerase aus Rattenleber. Baril et al. (1971) fanden für das gleiche Enzym jedoch ein Optimum, das bei pH 9.0 lag.

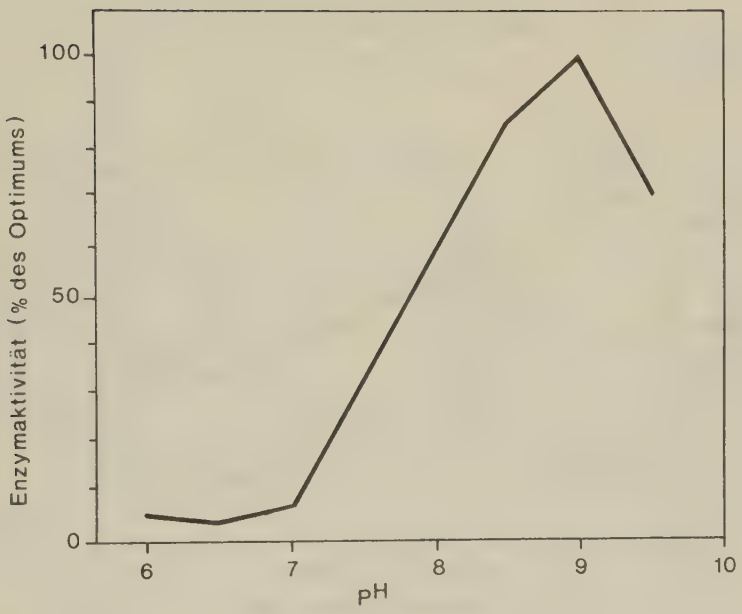

Abbildung 5 - Abhängigkeit der DNS-Polymerase β vom pH

Die Enzymaktivität wurde im üblichen β-Polymerase-Ansatz ermittelt, der einzig dadurch modifiziert wurde, dass Tris-HCl-Puffer mit pH 6.0 bis 9.5 zur Verwendung kamen.

5.7. ABHAENGIGKEIT VON DER Na^+- und K^+-Konzentration

K^+ stimulierte die β-Polymerase deutlich in einem breiten Optimumsbereich von 100 bis 250 mM (Abb. 6). Im Gegensatz dazu hatte Na^+ einen geringen Effekt (Abb. 6). Entsprechende Befunde wurden von anderen Autoren erhoben (Sedwick et al., 1972; Chang, 1973a; Hecht, 1975; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977).

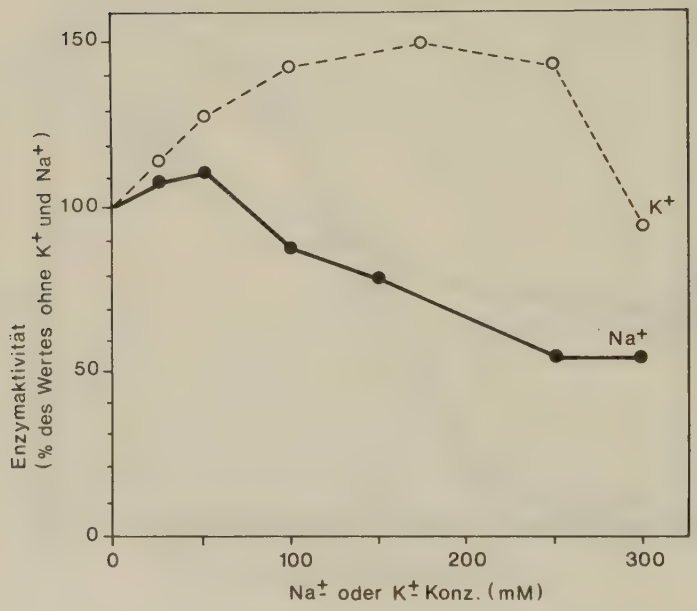

Abbildung 6 - Abhängigkeit von der Na^+- und K^+-Konzentration

Das gereinigte Enzym wurde gegen 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA und 10% (v/v) Glycerin erschöpfend dialysiert. Die Enzymaktivitäten wurden dann entweder mit steigender Na^+-Konzentration ohne K^+ (●——●) oder mit steigender K^+-Konzentration ohne Na^+ (o---o) bestimmt.

5.8. ABHAENGIGKEIT VON DER Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Konzentration

Die Abb. 7A und B führen die Notwendigkeit von Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktoren deutlich vor Augen. Die stimulierende Wirkung von Mg^{2+} war viermal grösser als diejenige von Mn^{2+}. Die optimalen Konzentrationen lagen für Mg^{2+} bei 25 mM und für Mn^{2+} bei 0.3 mM. Dies stimmt gut überein mit den Befunden bei anderen β-Polymerasen, sowohl was die absolute Notwendigkeit als auch die optimalen

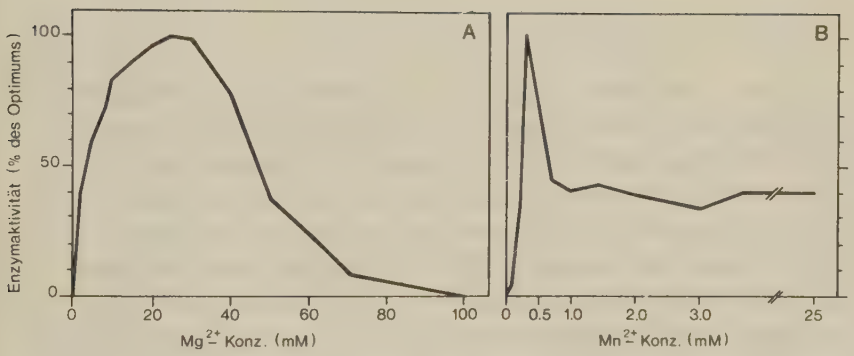

Abbildung 7 - Abhängigkeit von der Mg^{2+}- (A) und Mn^{2+}- (B) Konzentration

Konzentrationen von Mg^{2+} (5 - 25 mM) und Mn^{2+} (0.2 - 5 mM) anbelangt (Baril et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b; Weissbach et al., 1971; Sedwick et al., 1972; Chang, 1973a; Bollum, 1975; Stalker et al., 1977; Suzuki-Hori et al., 1977; Wang et al., 1977).

5.9. MATRIZEN-BEVORZUGUNG

Die Fähigkeit der β-Polymerase, natürliche und synthetische Matrizen zu lesen, sank in der Reihenfolge Poly(dA-dT) > Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$ > aktivierte DNS. Denaturierte DNS und Poly(dA) konnten

keine DNS-Polymeraseaktivität aufrecht erhalten. Im wesentlichen stimmt diese Matrizen-Bevorzugung mit den Literaturdaten überein (siehe Tab. 2).

5.10. FAEHIGKEIT ZUM LESEN VON POLY(A)·$(dT)_{12-18}$

Die Fähigkeit, eine Homopolyribonukleotid-Matrize zu lesen, gilt als allgemein anerkanntes Charakteristikum für β-Polymerasen (Tab. 2), wenn auch quantitative Unterschiede bestehen mögen (Chang und Bollum, 1971b; Chang, 1974; Spadari und Weissbach, 1974b; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977; Wang et al., 1977; Joenje und Benbow, 1978). Es erstaunte deshalb, dass das neuronale Enzym eine vernachlässigbar kleine Aktivität mit den üblichen Konzentrationen von 1.5 bis 2.5 µg Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ pro Ansatz zeigte (Tab. 3). Wurde die Menge der Matrize auf 5 µg erhöht, konnte eine kleine, jedoch signifikante Aktivität beobachtet werden. Dieses Verhalten der neuronalen β-Polymerase erinnerte an die Beschreibung desselben Phänomens bei der β-Polymerase aus KB-Zellen. Diese Eigenschaft wurde dort auf eine geringe Affinität zwischen dem Enzym und der Ribo-Matrize zurückgeführt (Wang et al., 1977). Die niedrige Aktivität der neuronalen Enzympräparation war nicht der Anwesenheit eines Inhibitors, wie z.B. Ribonuklease H (Joenje und Benbow, 1978) oder Phosphat (Knopf et al., 1976) zuzuschreiben. Dies ging aus einem Mischansatz hervor, in welchem die neuronale β-Polymerase zusammen mit einer DNS-Polymerase β aus HeLa-Zellen geprüft wurde. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der HeLa-Polymerase durch das Beimischen des neuronalen Enzyms nicht unterdrückt wurde (Tab. 3). Ganz im Gegenteil, das Mischen der beiden Enzyme ergab einen deutlichen Aktivitätsanstieg. Wurden die beiden Enzyme in Mengen miteinander gemischt, die mit der Kontroll-Matrize Poly(dA-dT) gleiche Aktivitäten ergaben, so stieg die Aktivität mit der Ribo-Matrize Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ auf das Doppelte des Wertes, der mit dem HeLa-Enzym allein erreicht wurde. Die halbe Menge HeLa-β-Polymerase wirkte auf das neuronale Enzym nur halb so stimulierend.

Tabelle 3 - Fähigkeit der neuronalen DNS-Polymerase β zum Lesen von Poly(A)·$(dT)_{12-18}$: Mischexperimente mit β-Polymerase aus HeLa-Zellen

Die DNS-Polymerase β-Aktivität wurde in einem Volumen von 0.1 ml bestimmt. Das Reaktionsgemisch enthielt als Matrize entweder 1.5 bis 10 µg Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ oder 2.5 µg Poly(dA-dT), daneben 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 21 µM [^{3}H]dTTP (2 x 10^4 Bq, entsprechend 0.54 µCi), 0.3 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, 0.1 M KCl und 0.5 mg/ml Rinderserumalbumin.

Experiment	Neuronale β-Polymerase	β-Polymerase aus HeLa-Zellen	Poly(A) $(dT)_{12-18}$	Poly)dA-dT)	Enzymaktivität
	µg/Nachweis	µg/Nachweis	µg/Nachweis	µg/Nachweis	cpm
Ribo-Matrize					
Kein Enzym	-	-	2.5	-	33
Neuronales Enzym allein	0.075	-	1.5	-	64
	0.075	-	2.5	-	67
	0.075	-	5.0	-	142
	0.075	-	10.0	-	93
Enzym aus HeLa-Zellen allein	-	1.0	2.5	-	9605
Neuronales Enzym gemischt mit Enzym aus HeLa-Zellen	0.075	1.0	2.5	-	18910
	0.075	0.5	2.5	-	10810
Desoxyribo-Matrize					
Neuronales Enzym allein	0.075	-	-	2.5	20198
Enzym aus HeLa-Zellen allein	-	0.5	-	2.5	20005

Dies legt die Vermutung nahe, dass in der Enzympräparation aus HeLa-Zellen ein dissoziierbarer Aktivator vorhanden war, der im neuronalen β-Polymerase-Präparat fehlte. Um welche Art von Aktivator es sich dabei handelte ist bis jetzt noch nicht klar. Ebensowenig weiss man, ob im neuronalen Gewebe solch ein Aktivator überhaupt vorhanden ist, oder ob dieser während der Reinigung verloren ging. Jedenfalls geben der Bedarf eines solchen Aktivators, und die Möglichkeit, dass verschiedene Gewebe unterschiedliche Mengen davon enthalten, eine Erklärung für die ungleiche Fähigkeit verschiedener β-Polymerasen die Matrize Poly(A) $(dT)_{12-18}$ zu lesen (Chang und Bollum, 1971b; Chang, 1974; Spadari und Weissbach, 1974b; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977; Wang et al., 1977; Joenje und Benbow, 1978).

5.11. BESTIMMUNG DER MICHAELISKONSTANTE

K_m wurde aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm der Abb. 8 berechnet. Sie liegt bei 16.5 µM und damit im Bereich der meisten der früher gefundenen Werte von 5 bis 12 µM (Chang, 1973c; Spadari und Weissbach, 1974b; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977). Die einzige Ausnahme bildet die β-Polymerase aus KB-Zellen mit einer K_m von 160 µM (Sedwick et al., 1972).

5.12. FAEHIGKEIT ZUM EINBAU EINES EINZELNEN DESOXYRIBONUKLEOSIDTRIPHOSPHATES

Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, war die neuronale β-Polymerase in hohem Masse befähigt, ein einzelnes Desoxyribonukleosidtriphosphat einzubauen. Nach 30 min betrug die Inkorporation 80% des Wertes, der mit allen vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten erreicht wurde. Als Kontrolle diente die DNS-Polymerase γ (Hübscher et al., 1977b), welche unter gleichen Bedingungen keine Aktivität zeigte. Die Fähigkeit der β-Polymerase, ein einziges Desoxyribo-

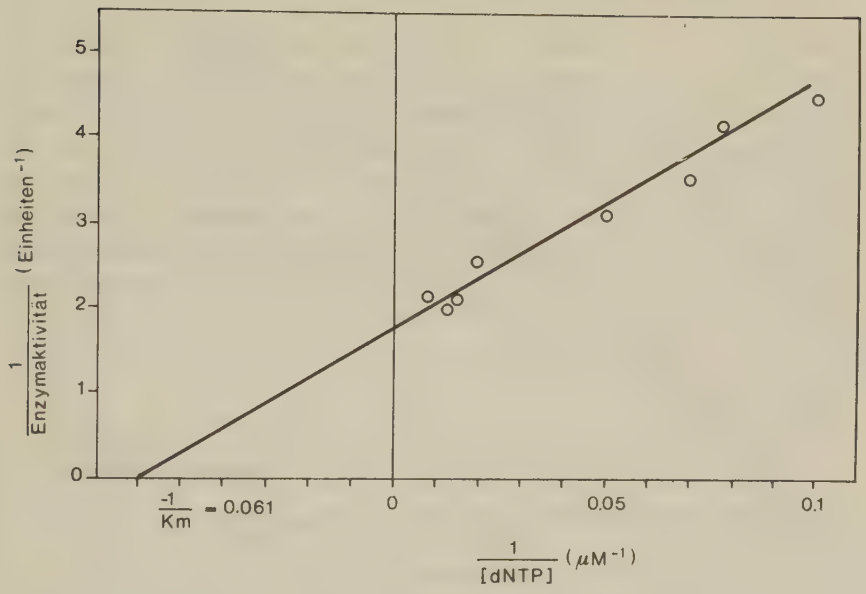

Abbildung 8 - Lineweaver-Burk-Diagramm für den Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten durch die DNS-Polymerase β

Die Michaeliskonstante für den Einbau aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate wurde im üblichen Ansatz für die β-Polymerase-Bestimmung ermittelt. Die Substratkonzentration ist definiert als die Konzentration jedes der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP).

nukleosidtriphosphat zu gebrauchen, ist ein gut bekanntes Phänomen (Haines et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b; Weissbach et al., 1971; Chang, 1973a; Wang et al., 1974; Stalker et al., 1977; Suzuki-Hori et al., 1977). Kürzlich wurde für die DNS-Polymerase β aus KB-Zellen aufgrund dieser Eigenschaft gezeigt, dass sie die Synthese der DNS nicht kontinuierlich fortsetzt, sondern sich

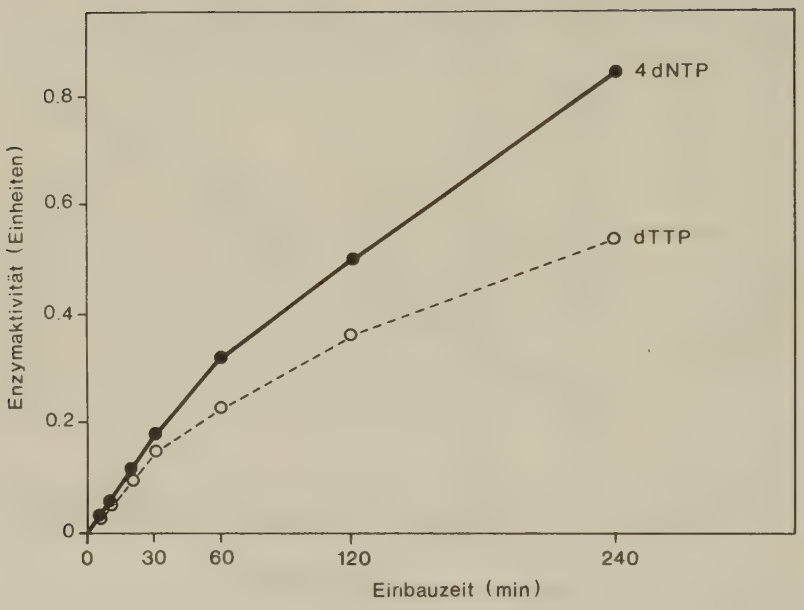

Abbildung 9 - Einbaukinetik von Desoxyribonukleosidtriphosphaten

Der Einbau aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (4 dNTP, •——•) ist verglichen mit demjenigen von dTTP allein (o---o). Die Bestimmung wurde im üblichen Ansatz für die β-Polymerase ausgeführt mit der einzigen Ausnahme, dass für die Kinetik des einzelnen Desoxyribonukleosidtriphosphates (dTTP) die drei andern Nukleosidtriphosphate (dATP, dGTP und dCTP) weggelassen wurden.

nach dem Einbau jedes Nukleotids wieder vom DNS-Strang ablöst und für den nächsten Syntheseschritt erneut an die Matrize bindet (Bambara et al., 1978). Diese Arbeitsweise wird als nicht-prozessiv bezeichnet. Offenbar gilt sie auch für die β-Polymerase aus Neuronen.

5.13. FEHLEN VON 3'-5'-EXONUKLEASE-AKTIVITAET

Die gereinigte neuronale β-Polymerase zeigte keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dieser Mangel an assoziierter Exonuklease-Aktivität wurde bereits früher bei anderen β-Polymerasen beobachtet (Baril et al., 1971; Chang und Bollum, 1971b, 1973b; Sedwick et al., 1972; Adams et al., 1973; Wang et al., 1974; Bollum, 1975; Stalker et al., 1977; Falaschi und Spadari, 1978). Zudem zeigte dieses Resultat, dass das hier beschriebene Präparat frei war von kontaminierenden Exonukleasen.

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neuronale DNS-Polymerase β bezüglich enzymologischer und physikochemischer Eigenschaften mit β-Polymerasen aus anderen Geweben und Zellen identisch ist (Baril et al., 1971; Berger et al., 1971; Haines et al., 1971; Chang und Bollum, 1971a, b; Weissbach et al., 1971; Fridlender et al., 1972; Sedwick et al., 1972; Smith und Gallo, 1972; Chang, 1973a, b, c, 1974; Spadari et al., 1974a; Spadari und Weissbach, 1974b; Wang et al., 1974; Bekkering-Kuylaars und Campagnari, 1974; Bollum, 1975; Hecht, 1975; Lazarus und Kitron, 1975; Tsuruo und Hirayama, 1975; Stalker et al., 1976; Suzuki-Hori et al., 1977). Anderseits steht seit kurzem fest, dass die neuronale β-Polymerase als Reparaturenzym in den DNS-Stoffwechsel eingreift (Hübscher et al., 1978, 1979). In Uebereinstimmung mit früheren Hinweisen (Bertazzoni et al., 1976; Hübscher et al., 1976a; Spadari et al., 1978) legen diese beiden Tatsachen den Schluss nahe, dass die Fähigkeit, geschädigte DNS zu reparieren, eine allgemeine Eigenschaft aller β-Polymerasen ist.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Nervenzellen der Grosshirnrinde der Ratte wurde eine DNS-Polymerase β isoliert. Der Vergleich mit β-Polymerasen aus anderen Zellen und Geweben ergab Uebereinstimmung in allen untersuchten Punkten, nämlich im chromatographischen Verhalten auf vier Säulen, im Molekulargewicht (51 000), in der Sedimentation (3.3 S), im isoelektrischen Punkt (pH 8.3), in der Resistenz gegen N-Aethylmaleinimid (10 mM) sowie in den optimalen Anforderungen an pH (9.0), Na^+ (25 bis 50 mM), K^+ (100 bis 250 mM), Mg^{2+} (25 mM) und Mn^{2+} (0.3 mM). Die Matrizen-Bevorzugung sank in der Reihenfolge Poly(dA-dT) > Poly(dA)·$(dT)_{12-18}$ > aktivierte DNS. Denaturierte DNS und Poly(dA) vermochten keine Aktivität aufrecht zu erhalten, jedoch bestand die Fähigkeit, Poly(A)·$(dT)_{12-18}$ zu lesen. Weitere Kriterien, welche die weitgehende Identität aller β-Polymerasen vor Augen führten, waren K_m (16.5 mM), die Möglichkeit ein einzelnes Desoxyribonukleosidtriphosphat einzubauen (80% Inkorporation nach 30 min, verglichen mit der Totalinkorporation in Gegenwart aller 4 Triphosphate) und das Fehlen von 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Aus diesem einheitlichen Erscheinungsbild aller untersuchten DNS-Polymerasen β und der kürzlich bekannt gewordenen Fähigkeit des neuronalen Enzyms, durch UV-Licht geschädigte DNS zu reparieren (Hübscher et al., 1978, 1979) lässt sich schliessen, dass allgemein den β-Polymerasen eine Funktion bei der DNS-Reparatur zukommt.

SUMMARY

DNA polymerase β was isolated from neuronal cell bodies of the rat forebrain cortex and was compared with DNA polymerases β from other tissues and cells. Virtual identity was established by the following criteria : chromatographic behaviour in four column systems; molecular weight (51 000); sedimentation (3.3 S); isoelectric point (pI 8.3); resistance to N-ethylmaleimide (10 mM); optimal requirements for pH (9.0), Na^+ (25-50 mM), K^+ (100-250 mM), Mg^{2+} (25 mM) and Mn^{2+} (0.3 mM); template preference in the order poly(dA-dT) > poly(dA) · $(dT)_{12-18}$ > activated DNA; lack of activity both with denatured DNA and poly(dA); ability to read poly(A)· $(dT)_{12-18}$; K_m (16.5 µM); capacity to incorporate a single deoxyribonucleoside triphosphate (80% of the incorporation of all four triphosphates after 30 min) and lack of 3'-5'-exonuclease activity. From this close similarity of all known β-polymerases and the recently established role of the neuronal enzyme in DNA repair (Hübscher et al., 1978, 1979) we conclude that, quite generally, β-polymerases function in DNA repair.

8. LITERATURVERZEICHNIS *

1. Adams, R.L.P., Maureen, A.L., Henderson, A.L., Wood, W. and Lindsay, J.G. (1973)
Multiple forms of nuclear deoxyribonucleic acid polymerases and their relationship with the soluble enzyme
Biochem J, 131, 237-246

2. Alberts, B. and Sternglanz, R. (1977)
Recent excitement in the DNA replication problem
Nature, 269, 655-661

3. Anderson, S., Kaufmann, G. and De Pamphilis, M.L. (1977)
RNA primers in SV 40 DNA replication : Identification of transient RNA-DNA covalent linkages in replicating DNA
Biochemistry, 16, 4990-4998

4. Andrews, P. (1964)
The gel-filtration of proteins related to their molecular weights over a wide range
Biochem J, 96, 595-605

5. Bambara, R.A., Uyemura, D. and Choi, T. (1978)
On the processive mechanism of Escherichia coli DNA polymerase I
J Biol Chem, 253, 413-423

6. Baril, E.F., Brown, O.E., Jenkins, M.D. and Laszlo, J. (1971)
Deoxyribonucleic acid polymerase with rat liver ribosomes and smooth membranes. Purification and properties of the enzymes
Biochemistry, 10, 1981-1992

7. Baril, E.F., Jenkins, M.D., Brown, D.E., Laszlo, J. and Morris, H.P. (1973)
DNA polymerase I and II in regenerating rat liver and Morris hepatomas
Cancer Res, 33, 1187-1193

8. Bekkering-Kuylaars, S.A.M. and Campagnari, F. (1974)
Characterization and properties of a DNA polymerase partially purified from the nuclei of calf thymus cells
Biochim Biophys Acta, 349, 277-295

9. Berger, H. Jr., Huang, R.C.C. and Irvin, J.L. (1971)
Purification and characterization of a deoxyribonucleic acid polymerase from rat liver
J Biol Chem, 246, 2275-2283

---

* Abkürzungen der Zeitschriften-Namen nach "Current Contents", 21 (40), 208-218 (1978)

10. Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedraly Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. and Spadari, S. (1976)
Variations of DNA polymerases α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes
Proc Nat Acad Sci US, 73, 785-789

11. Bertazzoni, U., Scovassi, A.I. and Brun, G. (1977)
Chick embryo DNA polymerase γ identity of γ-polymerases purified from nuclei and mitochondria
Eur J Biochem, 81, 237-248

12. Bolden, A., Pedraly Noy, G. and Weissbach, A. (1977)
DNA polymerase of mitochondria is a γ-polymerase
J Biol Chem, 252, 3351-3356

13. Bollum, F.J. (1968)
Filter paper disk techniques for assaying radioactive macromolecules
in : Methods in Enzymology, Vol 2, Grossman, L. and Moldave, K., Ed., Academic Press, New York, pp 169-173

14. Bollum, F.J. (1975)
Mammalian DNA polymerases
in : Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 15, Davidson, J.N. and Cohen, W.E., Ed., Academic Press, New York, San Francisco and London, pp 109-145

15. Bregnard, A., Knüsel, A. and Kuenzle, C.C. (1975)
Are all the neuronal nuclei polyploid
Histochemistry, 43, 59-61

16. Bregnard, A., Kuenzle, C.C. and Ruch, F. (1977)
Cytophotometric and autoradiographic evidence for postnatal DNA synthesis in neurons of the rat cerebral cortex
Exp Cell Res, 107, 151-157

17. Brutlag, D. and Kornberg, A. (1972)
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid
J Biol Chem, 247, 1241-1248

18. Chang, L.M.S. and Bollum, F.J. (1971a)
Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase in mammalian cells
J Biol Chem, 246, 5835-5837

19. Chang, L.M.S. and Bollum, F.J. (1971b)
Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from rabbit bone marrow
Biochemistry, 11, 1264-1272

20. Chang, L.M.S. and Bollum, F.J. (1972)
Variation of deoxyribonucleic acid polymerase activities during rat liver generation
J Biol Chem, 247, 7948-7950

21. Chang, L.M.S. (1973a)
Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. I. Preparation of homogenous enzyme
J Biol Chem, 248, 3789-3795

22. Chang, L.M.S. and Bollum, F.J. (1973b)
A comparison of associated enzyme activities in various deoxyribonucleic acid polymerases
J Biol Chem, 248, 3398-3404

23. Chang, L.M.S. (1973c)
Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. II. Initiation and identity of homopolymer replication
J Biol Chem, 248, 6983-6992

24. Chang, L.M.S., Brown, Mc K. and Bollum, F.J. (1973d)
Induction of DNA polymerase in mouse L cells
J Mol Biol, 74, 1-8

25. Chang, L.M.S. (1974)
Replication of initiated polyribonucleic acid by mammalian low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase
J Biol Chem, 249, 7441-7446

26. Chiu, F.J. and Sung, S.C. (1972)
Pattern in developmental changes in two DNA polymerases of rat brain
Biochim Biophys Acta, 269, 364-369

27. Chiu, R.W. and Baril, E.F. (1975)
Nuclear DNA polymerases and the HeLa cell cycle
J Biol Chem, 250, 7951-7957

28. Claycomb, W.C. (1975)
Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation
J Biol Chem, 250, 3229-3235

29. Coleman, M.S., Hutton, J.J. and Bollum, F.J. (1974)
Is terminal deoxynucleotidyltransferase a somatic mutagen in lymphocytes
Nature, 248, 407-409

30. Craig, R.K., Costello, P.A. and Keir, H.M. (1975)
Deoxyribonucleic acid polymerases of BHK-21/C 13 cells
Relationship to physiological state of the cells, and to synchronous induction of synthesis of deoxyribonucleic acids
Biochem J, 145, 233-240

31. Davies, H. (1975)
Thin-layer gel isoelectric focusing
in : Isoelectric Focusing, Arbuttsnot, J.P. and Beeley, J.A., Ed., Butterworths, London, pp 97-113

32. Edenberg, H.J. and Huberman, J.A. (1975)
Eukariotic DNA replication
Annu Rev Genet, 9, 245-284

33. Edenberg, H.J., Anderson, S. and De Pamphilis, M.L. (1978)
Involvement of DNA polymerase α in simian virus 40 DNA replication
J Biol Chem, 253, 3273-3280

34. Eichler, D.C., Wang, T.S.F., Clayton, D.A. and Korn, D. (1977)
In vitro replication of mitochondrial DNA
J Biol Chem, 252, 7888-7893

35. Eliasson, R. and Reichard, P. (1978)
Primase initiates okazaki pieces during polyoma DNA synthesis
Nature, 272, 184-185

36. Falaschi, A. and Spadari, S. (1978)
The three DNA polymerases of animal cells: Properties and functions
In : DNA Synthesis - Present and Future, Molineux, I. and Kohiyama, M., Ed., Plenum Press, New York, pp 487-515

37. Fanning, E., Klempnauer, K.H., Otto, B., Schlaeger, E.J. and Kuippers, R. (1978)
DNA Polymerase in Chromatin
In : DNA Synthesis - Present and Future, Molineux, I. and Kohiyama, M., Ed., Plenum Press, New York, pp 613-628

38. Friedlender, B., Fry, M., Bolden, A. and Weissbach, A. (1972)
A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells
Proc Nat Acad Sci US, 69, 452-455

39. Haines, M.E., Holmes, A.M. and Johnston, I.R. (1971)
Distinct cytoplasmic and nuclear DNA polymerases from rat liver
FEBS Lett, 17, 63-67

40. Hecht, N.B. (1975)
The relationship between two murine DNA-dependent DNA polymerases from cytosol and the low molecular weight DNA polymerase
Biochim Biophys Acta, 383, 388-398

41. Herrick, G., Delius, H. and Alberts, B. (1976)
Syngle stranded DNA structure and DNA polymerase activity in the presence of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus
J Biol Chem, 251, 2142-2146

42. Hirai, K. and Watanate, Y. (1976)
Induction of α-type DNA polymerases in human cytomegalovirus infected Wi-38 cells
Biochim Biophys Acta, 447, 328-339

43. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1977a)
Variation of DNA polymerases α, β and γ during perinatal tissue growth and differentiation
Nucl Acid Res, 4, 2917-2929

44. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1977b)
Identity of DNA polymerase γ from synaptosomal mitochondria and rat brain nuclei
Eur J Biochem, 81, 249-258

45. Hübscher, U., Kuenzle, C.C., Limacher, W., Scherrer, P. and Spadari, S. (1978)
Functions of DNA polymerases α, β and γ in neurons during development
Cold Spring Harbor Symp, 43, in press

46. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1979)
Functional roles of DNA polymerases β and γ, submitted

47. Joenje, H. and Benbow, R.M. (1978)
A low molecular weight DNA polymerase from ovaries of the frog Xenopus laevis
J Biol Chem, 253, 2640-2649

48. Kaufmann, G., Anderson, S. and De Pamphilis, M.L. (1978)
J Mol Biol, in press

49. Knopf, K.W., Yamada, M. and Weissbach, A. (1976)
HeLa cell DNA polymerase γ : Further purification and properties of the enzyme
Biochemistry, 15, 4540-4548

50. Kuenzle, C.C., Bregnard, A., Hübscher, U. and Ruch, F. (1978)
Extra DNA in forebrain cortical neurons
Exp Cell Res, 113, 515-160

51. Lazarus, L.H. and Kitron, N. (1975)
Differentiation and characterization of the cytoplasmic and nuclear deoxyribonucleic acid polymerase from baby hamster kidney cells
Biochim Biophys Acta, 402, 309-322

52. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent
J Biol Chem, 193, 265-275

53. Martin, R.G. and Ames, B. (1961)
A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes : Application to protein mixtures
J Biol Chem, 236, 1372-1379

54. Mayer, R.J., Smith, R.G. and Gallo, R.L. (1975)
DNA metabolizing enzymes in normal human lymphoid cells. Induction of DNA polymerases α, β and γ following stimulation with phytohemagglutinin
Blood, 46, 509-518

55. Mosbough, D.W., Stalker, D.M., Probst, G.S. and Meyer, R.R. (1977)
Novikoff hepatoma deoxyribonucleic acid polymerase. Identification of a stimulatory protein bound to the β-polymerase
Biochemistry, 16, 1512-1518

56. Otto, B., Baynes, M. and Knippers, R. (1977)
A single-strand-specific DNA binding protein from mouse cells that stimulates DNA polymerase
Eur J Biochem, 73, 17-24

57. Reichard, P., Eliasson, R. and Söckermann, G. (1974)
Initiator RNA in discontinious polyoma DNA synthesis
Proc Nat Acad Sci US, 71, 4901-4905

58. Righetti, P.G. and Caravaggio, P. (1976)
Isoelectric points and molecular weights of proteins
J Chromatogr, 127, 1-28

59. Roodman, G.D., Hutton, J.J. and Bollum, F.J. (1976)
DNA polymerase, thymidine kinase and DNA synthesis in erythropoietic mouse spleen cells separated on bovine serum albumin gradients
Biochim Biophys Acta, 425, 478-491

60. Roufa, D.J., Moses, R.E. and Reed, S.J. (1975)
The DNA polymerases of chinese hamster cells
Arch Biochem Biophys, 167, 547-559

61. Sedwick, W.D., Wang, T.S.F. and Korn, D. (1972)
Purification and properties of nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerases from human KB cells
J Biol Chem, 247, 5026-5033

62. Sellinger, O.Z. Azcurra, J.M., Johnson, D.E., Ohlsson, W.G. and Lodin, Z. (1971)
Independence of protein synthesis and drug uptake in nerve cell bodies and glial cells isolated by a new technique
Nat new Biol, 230, 253-256

63. Smith, R.G. and Gallo, R.C. (1972)
DNA-dependent DNA polymerases I and II from normal human-blood lymphocytes
Proc Nat Acad Sci US, 69, 2879-2884

64. Spadari, S., Muller, R. and Weissbach, A. (1974a)
The dissimilitude of the low and high molecular weight deoxyribonucleic acid polymerases of HeLa cells
J Biol Chem, 249, 2991-2992

65. Spadari, S. and Weissbach, A. (1974b)
Separation and characterization of two enzymatic activities
J Biol Chem, 249, 5809-5815

66. Spadari, S. and Weissbach, A. (1974c)
The interrelation between DNA synthesis and various DNA polymerase activities in synchronized HeLa cells
J Mol Biol, 86, 11-20

67. Spadari, S. and Weissbach, A. (1975)
RNA primed DNA synthesis : specific catalysis by HeLa cell DNA polymerase α
Proc Nat Acad Sci US, 72, 503-507

68. Spadari, S., Villani, G. and Hardt, N. (1978)
DNA polymerase α, β and γ activities in rabbit spleen cell populations stimulated by various doses of concanavalin A
Exp Cell Res, 113, 51-62

69. Stalker, D.M., Mosbough, D.W., and Meyer, R.R. (1976)
Novikoff hepatoma deoxyribonucleic acid polymerase. Purification and properties of a homogenous β-polymerase
Biochemistry, 15, 3114-3121

70. Susumu, I., Tabahiko, T. and Mochihiko, O. (1978)
Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α
Nature, 275, 458-460

71. Suzuki-Hori, C., Nagano, H. and Mano, Y. (1971)
DNA polymerase β from the nuclear fraction of sea urchin embryos. Characterization of the purified enzyme
J Biochem (Tokyo), 82, 1613-1621

72. Tseng, B.Y. and Goulian, M. (1977)
Evidence for covalent association of RNA with nascent DNA in human lymphocytes
Fed Proc, 36, 654

73. Tsuruo, T., Hirayama, K. and Tyunosin, U. (1975)
Three DNA polymerases of rat ascites hepatoma cells : Properties of the enzymes and effect of RNA synthesis on the reactions
Biochim Biophys Acta, 383, 274-281

74. Waqar, M.A. and Huberman, J.A. (1975)
Covalent attachment of RNA to nascent DNA in mammalian cells
Cell, 6, 551-557

75. Waqar, M.A., Huberman, J.A. and Evans, M.J. (1977)
DNA polymerases bound to replicating SV 40 chromosomes
Fed Proc, 36, 654

76. Waqar, M.A., Evans, M.J. and Huberman, J.A. (1978)
Effect of 2'-3'-deoxythymidine-5'-triphosphate on HeLa cell in vitro DNA synthesis : Evidence that DNA polymerase α is the only polymerase required for cellular DNA replication
Nucl Acid Res, 5, 1933-1946

77. Wang, T.S.., Sedwick, W.D. and Korn, D. (1974)
Nuclear deoxyribonucleic acid polymerase
J Biol Chem, 249, 841-850

78. Wang, T.S.F., Eichler, D.C. and Korn, D. (1977)
Effect of Mn^{2+} on the in vitro activity of human deoxyribonucleic acid polymerase β
Biochemistry, 16, 4927-4933

79. Weissbach, A., Schlabach, A., Fridlender, B. and Bolden, A. (1971)
DNA polymerases from human cells
Nat new Biol, 231, 167-170

80. Weissbach, A. (1977)
Eucariotic DNA polymerases
Annu Rev Biochem, 46, 25-47

81. William, L.E., Surrey, S. and Lieberman, I. (1975)
Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver
J Biol Chem, 250, 8179-8183

9. DANKESADRESSEN

Folgenden Damen und Herren danke ich herzlich für ihre Mitarbeit:

Herrn Prof. Dr. C.C. Kuenzle für die Ueberwachung der experimentellen Arbeit, die Korrektur des Manuskripts und das Referat

Herrn Prof. Dr. E. Jenny für das Korreferat

Herrn Dr. U. Hübscher für die Beratung

Fräulein B. Meier für die technische Assistenz

Frau J.M. Burger für die Niederschrift des Manuskripts

Frau S. Pletscher für die graphischen Darstellungen

Frau A. Hug für die photographische Gestaltung.

10. LEBENSLAUF

Waser Jürg, geboren am 17. April 1951 in Zürich, Bürger von Adlikon (ZH) und Zürich, verheiratet

1958 - 1967	Volksschule in Zürich
1967 - 1971	Oberrealschule Zürichberg
1971	Matura Typus C
1971 - 1976	Studium der Tiermedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
1976	Eidgenössisches Staatsexamen als Tierarzt
Winter 1976/77	Assistent in der Praxis von Dr. W. Müller, Berg (TG)
1977 - 1978	Assistent und Doktorand am Institut für Pharmakologie und Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
1978 - 1979	Besuch des Postgraduate-Kurses für experimentelle Medizin und Biologie in Zürich.